

S2 1 PN='JP 10179150'

? t s2/9/1

2/9/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

012014032

WPI Acc No: 1998-430942/ 199837

XRAM Acc No: C98-130091

XRPX Acc No: N98-336582

**Culture of hepatocytes and determination of drug metabolising ability -  
used in synthesis of phenobarbital induced type cytochrome P-450**

Patent Assignee: SUMITOMO BAKELITE CO LTD (SUMB )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No Kind Date Applicat No Kind Date Week

JP 10179150 A 19980707 JP 97215246 A 19970808 199837 B

Priority Applications (No Type Date): JP 96279082 A 19961022

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

JP 10179150 A 4 C12N-005/06

Abstract (Basic): JP 10179150 A

A method for culture of hepatocytes using a culture gel bed mainly comprises type I collagen free from telopeptide or a reducing agent treated telopeptide, and a culture soln. contg. 0.5-3 v/v% of DMSO and a cpd. having an expression inductive action of phenobarbital induced type cytochrome P-450, opt. contg. no serum and contg. 0.00000001-0.000001 M of sodium selenite used for determn. of drug metabolising ability.

USE - Used in synthesis of phenobarbital induced type cytochrome P-450.

ADVANTAGE - Application for safety and toxicity evaluation studies of test substances.

Dwg.0/3

Title Terms: CULTURE; DETERMINE; DRUG; METABOLISM; ABILITY; SYNTHESIS;  
PHENOBARBITAL; INDUCE; TYPE; CYTOCHROME; P

Derwent Class: B04; D16; S03

International Patent Class (Main): C12N-005/06

International Patent Class (Additional): G01N-033/15

File Segment: CPI; EPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-F02; B12-K04; D05-H08; D05-H09

Manual Codes (EPI/S-X): S03-E14A1

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* M423 M720 M781 M903 N102 P831 Q233 V600 V643 V754

Chemical Fragment Codes (M6):

\*02\* M903 P831 Q233 R521 R623

Derwent Registry Numbers: 0274-U; 1151-U; 1997-11

? logoff

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-179150

(43) 公開日 平成10年(1998) 7月7日

(51) Int.Cl.<sup>9</sup>

識別記号

F I

C 1 2 N 5/06

C 1 2 N 5/00

E

G 0 1 N 33/15

G 0 1 N 33/15

Z

審査請求 未請求 請求項の数5 O L (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平9-215246

(22) 出願日 平成9年(1997) 8月8日

(31) 優先権主張番号 特願平8-279082

(32) 優先日 平8(1996)10月22日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000002141

住友ベークライト株式会社

東京都品川区東品川2丁目5番8号

(72) 発明者 澤井 博

秋田市土崎港相築町字中島下27-4 秋田

住友ベークライト株式会社内

(72) 発明者 栗田 徹一

東京都品川区東品川2丁目5番8号 住友

ベークライト株式会社内

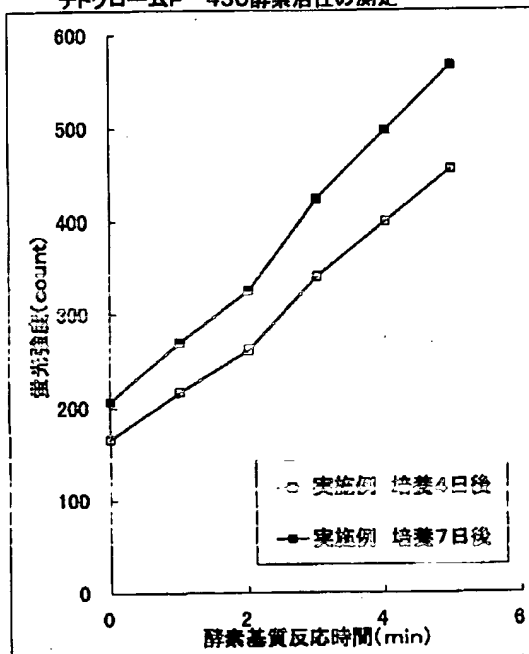
(54) 【発明の名称】 肝細胞培養方法及び薬物代謝能測定方法

(57) 【要約】

【課題】 肝細胞を生体内と類似の環境に保った後、培養液にフェノバルビタール誘導型チトクロームP-450の発現誘導作用を有する化合物を投与することにより、フェノバルビタール誘導型チトクロームP-450の酵素活性の発現を誘導し、さらにフェノバルビタール誘導型チトクロームP-450の酵素活性が発現されている培養細胞を用いて、薬物代謝能を測定する方法を提供することである。

【解決手段】 アロパグチドが取り除かれたもしくは還元剤で処理されたI型コラーゲンを主成分とするゲルを培養床として用い、かつ0.5～3体積%のDMSOとフェノバルビタール誘導型のチトクロームP-450の発現誘導作用を有する化合物を含有した培養液を用いる肝細胞培養方法。

チトクロームP-450酵素活性の測定



**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 テロペプチドが取り除かれたもしくは還元剤で処理されたI型コラーゲンを主成分とするゲルを培養床として用い、かつ0.5～3体積%のDMSOとフェノバルビタール誘導型のチトクロームP-450の発現誘導作用を有する化合物を含有した培養液を用いることを特徴とする肝細胞培養方法。

【請求項2】 培養液に血清を含まず、亜セレン酸ナトリウムを $10^{-8}$ ～ $10^{-6}$ M含有する請求項1記載の肝細胞培養方法。

【請求項3】 フェノバルビタール誘導型のチトクロームP-450の発現誘導作用を有する化合物がフェノバルビタールもしくはフェノバルビタール塩であり、培養液中に0.5～3mM含有する請求項1記載の肝細胞培養方法。

【請求項4】 培養される肝細胞が初代培養肝細胞である請求項1、2又は3記載の肝細胞培養方法。

【請求項5】 請求項1、2、3又は4記載の肝細胞培養方法を用いた薬物代謝能測定方法。

**【発明の詳細な説明】**

【発明の属する技術分野】本発明は、生体外で肝細胞の培養において、フェノバルビタール誘導型のチトクロームP-450の維持が可能となる培養方法及び薬物代謝能測定方法に関するものである。

【従来の技術】従来、新規の化学物質や医薬品の安全性試験は動物の個体を使って行われてきており、薬物の動態と代謝や生体内の物質の合成について検討が行われている。特に肝細胞の物質の吸収、代謝、排泄への関与が重要とされている。しかし、動物を用いた実験では、検査結果の定量化や因果関係の判定が困難である等の欠点を有し、一種類の物質に多数の動物個体を必要とする。そのため、血清に含まれる不明成分がないシンプルにモデル化されていて、使用する実験動物の数を削減した細胞培養による実験が試みられている。肝細胞を生体外に取り出して培養実験を行うことに関しては、3次元的な肝細胞の凝集塊を形成させて、肝細胞の形態を生体内と類似の環境を保つ方法が考えられている。当該分野において重要課題とされていることは、培養した肝細胞の機能が生体内における肝細胞の機能と同様に維持されることである。この課題を解決するために初代培養肝細胞を用いた3次元培養方法が行われており、細胞間基質を構成するタンパク質や生体適合性を有する高分子化合物を培養容器表面にコートしたり或いはゲルを構築して培養床を形成し、これに肝細胞を接触させて凝集塊を形成する培養法が開発されはじめている。例えば、スフェロイド培養法（日本動物実験代替法学会第5回大会要旨集p30～33（'91））や、マトリゲル培養法（日本動物実験代替法学会第5回大会要旨集p38～41（'91））を利用した方法がある。しかしながら、スフェロイド培養方法の場合、2～3週間以上の長期培

養によるスフェロイド中心部の細胞壊死や、内部細胞への物質の浸透性に問題がある。マトリゲル培養法では、マトリゲルの構成物が完全に解明されておらず、添加した被検物質の単独の効果なのか明確でない場合がある。またこれらの培養法では、重要な肝細胞特異機能の指標となる物質の合成や代謝の検出ができないなど、生体内の肝細胞の状態の再現には十分にはあっていない。特にフェノバルビタール誘導型チトクロームP-450の酵素活性に関する機能の発現が不明成分を含まない培養系で維持された報告はない。

【発明が解決しようとする課題】そこで本発明では、以上のような従来技術の問題点を解決するために、以前に提案した動物細胞培養方法、すなわち、テロペプチドを取り除いたI型コラーゲンのゲルを培養床とし、特定の物質を添加した培養液とした培養法（特開平3-4780号公報）や還元処理されたI型コラーゲンのゲルを培養床とした培養法（特開平6-292565号公報）を用い、肝細胞を生体内と類似の環境に保った後、培養液にフェノバルビタール誘導型チトクロームP-450の発現誘導作用を有する化合物を投与することにより、フェノバルビタール誘導型チトクロームP-450の酵素活性の発現を誘導し、さらにフェノバルビタール誘導型チトクロームP-450の酵素活性が発現されている培養細胞を用いて、薬物代謝能を測定する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】本発明は、テロペプチドを取り除いたもしくは還元剤で処理されたI型コラーゲンをゲル化してなるコラーゲンゲルを培養床とし、培養液にDMSOとフェノバルビタール誘導型チトクロームP-450の発現誘導作用を有する化合物が添加されていることを特徴とする肝細胞培養方法であり、さらには本発明の培養方法を用いた薬物代謝能測定方法である。

【発明の実施に形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明に使用される培養床の主成分の原料であるI型コラーゲンは動物種、由来組織に限定されることはなく、適宜のものを使用できる。テロペプチドを取り除く方法としては、生体由来の酵素であるペプシンを使用する方法がある。また還元剤については水素化ホウ素ナトリウム等の水溶液が利用可能なものであって、エステルやアミドの還元は起こさず、アルデヒド基の還元を起こすものはすべて使用可能であり、適宜のものを使用できる。培養床はテロペプチドを取り除いた或いは還元剤で処理されたI型コラーゲンを主成分とし、当該コラーゲンを単独使用するものもしくは適宜の基質材料を共存せしめたもののいずれであっても使用可能であり、その主成分であるコラーゲンをゲル化させて、コラーゲンゲルの状態で培養床として使用する。ゲル形成の方法は、テロペプチドを取り除いた或いは還元剤で処理されたI型コラーゲンを主成分とする所望濃度のコラーゲン溶液を調製し、当該溶液を緩衝液などを用いて中性にし、20℃以

上、望ましくは37℃で静置すると数時間でゲル化する。培養液は、一般の動物細胞培養で広く用いられている培養液で好適なものを選択し、当該溶液にDMSOを0.5～3体積%、及びフェノバルビタール誘導型のチトクロームP-450の発現誘導作用を有する化合物を適宜の濃度で添加したものを使用できる。まず本発明に使用される培養床と一般の動物細胞培養で広く用いられている培養液で好適なものにDMSOを0.5～3体積%添加した培養液を使用して、肝細胞を培養し凝集塊を形成させる。肝細胞の凝集塊の形成方法は、肝細胞を培養基材の上に播きだけでよく、播種後、数時間～1日で肝細胞は培養基材の上面に接着し、2～3日後に凝集塊を形成する。肝細胞については、初代培養肝細胞、株化肝細胞に適用可能であり肝由来の細胞であればその種類は特に限定されるものではないが、初代培養肝細胞を用いたほうが好適である。肝細胞の凝集塊を形成した後、培養液を本発明に使用される培養液に切替えて培養を続行する。以上の培養法によって、培養肝細胞において、フェノバルビタール誘導型チトクロームP-450が発現し合成され、薬物代謝酵素の活性の維持が可能となる。さらに本発明による培養方法で培養されている肝細胞に、被検物質を投与して肝細胞の機能を評価することによって安全性毒性試験評価に利用することが可能である。

【実施例】以下、実施例により本発明についてさらに具体的に説明する。0～4℃の条件下で0.3重量%のペプシン処理されたI型コラーゲン酸性溶液と10倍炭酸のリン酸塩緩衝液と再構成用緩衝液（2.2%NaHCO<sub>3</sub>、4.77%HEPES、NaOH0.05N）を8:1:1の割合で混合し、培養容器の培養面に1～3mmの厚さになるように分注した後、37℃のインキュベータに静置し加温することで、コラーゲンゲルの培養床を作成した。L15培地にインシュリン10<sup>-7</sup>M、デキサメサゾン10<sup>-7</sup>M、EGF10ng/ml、プロリン30μg/ml、DMSO2%、亜セレン酸ナトリウム10<sup>-7</sup>Mを添加したものを調製し、0.22μmのフィルターにより濾過滅菌を行ったものを前培養用培養液として使用した。また、前培養を開始して2日後以降は、フェノバルビタール誘導型チトクロームP-450を誘導するために使用する培養液に、前述の培養液に誘導する化合物としてフェノバルビタールナトリウムを1mM添加したものを使用した。まず初代肝細胞を6週齢オスのウィスターラットの肝臓よりコラーゲナーゼ灌流法にて採取し、前述のコラーゲンゲルの培養床に5×10<sup>5</sup>個/cm<sup>2</sup>の濃度で播種し、37℃、5%炭酸ガスインキュベータ内で前培養を行い、肝細胞の凝集塊を形成

した。細胞を播種して2日後に、培養液を前培養用培養液からフェノバルビタールナトリウムを添加した培養液に切り替え、培養を継続した。陰性対照として培地を切り替えない場合の培養も継続した。なお培養液の交換は、細胞を播種後毎日実施した。細胞を播種してから4日または7日後に、コラーゲナーゼ溶液を用いて培養床のコラーゲンゲルを溶解し、肝細胞を回収した。培養した細胞のフェノバルビタール誘導型P-450の酵素活性を測定するために、細胞に0.1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>を加え超音波ホモゲナイザーで細胞を破碎し、遠心分離を2回行いミクロソームを回収した。0.1M-PBS

(-)によるミクロソームの分散液にペントキシシレゾルフィン、NADPHを加え、励起波長530nm、測定波長585nmの蛍光を経時的に測定し、生成されるヒドロキシシレゾルフィンの量を計測した。比較例1として、ペプシン処理されたI型コラーゲンを培養器にコートされた培養床を用い、実施例と同様の培養実験を実施した。比較例2として、実施例の前培養用培養液、フェノバルビタールナトリウムを添加した培養液よりDMSOを除いた培養液をそれぞれ作成し、実施例と同様の培養実験を実施した。結果を図1～3に示す。実施例では、肝細胞は凝集塊を形成し、ヒドロキシシレゾルフィンの生成が確認された。これより、フェノバルビタール誘導型P-450の酵素活性によりペントキシシレゾルフィンが代謝されることが認められた。一方、陰性対照であるフェノバルビタールナトリウムを含まない培養液では、肝細胞は凝集塊を形成したが、ヒドロキシシレゾルフィンの生成は認められなかった。比較例1、2では肝細胞は凝集塊を形成せず伸展してしまい、ヒドロキシシレゾルフィンの生成も認められなかった。したがって、フェノバルビタール誘導型P-450の酵素活性の発現も認められなかった。

【発明の効果】本発明の培養方法により、培養肝細胞においてフェノバルビタール誘導型チトクロームP-450が発現し合成され、薬物代謝酵素の活性の維持が可能となる。さらに本発明による培養方法で培養されている肝細胞に、被検物質を投与して肝細胞の機能を評価することによって安全性毒性試験評価に利用することが可能である。

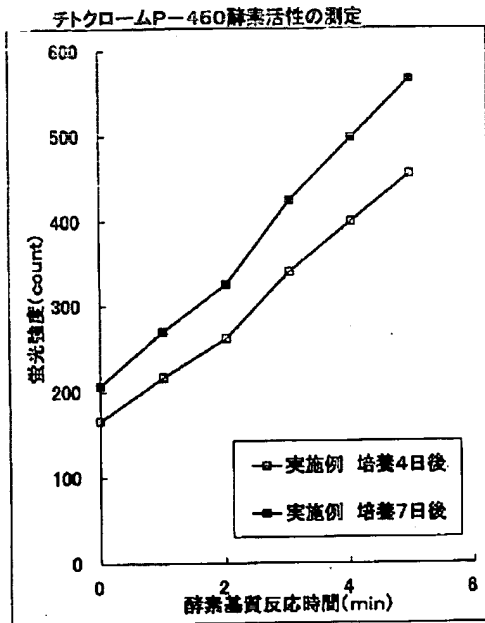
#### 【図面の簡単な説明】

【図1】実施例で生成されたヒドロキシシレゾルフィンによる蛍光強度の経時変化を示す。

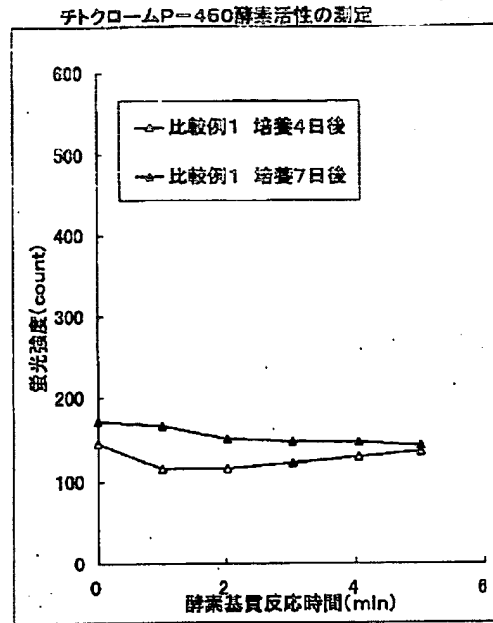
【図2】比較例1で生成されたヒドロキシシレゾルフィンによる蛍光強度の経時変化を示す。

【図3】比較例2で生成されたヒドロキシシレゾルフィンによる蛍光強度の経時変化を示す。

【図1】



【図2】



【図3】

